

Hastane Su Sistemlerinde *Legionella* Araştırılmasında Temel Prensipler

Efsun AKBAŞ

Serbest Uzman-Proje Danışmanı

ÖZET

Hastaneler Lejyoner hastalığı için önemli risk çevreleridir. Hastalığın önlenmesi, sistematik bir program yürütülmesi ve hastanede risk değerlendirilmesi ile birlikte aktif olgu sürveyansı yapılmasını gerektirmektedir. Su sisteminde *Legionella* varlığının aranması hastanelerde risk değerlendirmesinin bir bileşeni olarak kabul edilir. *Legionella* incelemesinden anlamlı bir sonuç elde edilebilmesi su örneklerinin tesisati iyi temsil edecek şekilde alınması ile başlayan bir süreçtir. Laboratuvarında örneklerin incelenmesinde kullanılan prosedürler ise bakterinin başarılı bir şekilde izolasyonuna izin vermelidir. Bu makalede, hastane kaynaklı Lejyoner hastalığının kontrolü temelinde, su sistemlerinde *Legionella* incelemesinin belli başlı prensipleri özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Lejyoner hastalığı, nozokomiyal enfeksiyon, su mikrobiyolojisi

SUMMARY

Basic Principles in Investigation of Legionella in Hospital Water Systems

Hospitals are major risk environments for Legionnaires' disease. Prevention of the disease requires implementation of a systematic program involving active case surveillance in conjunction with the risk assessment in the hospital. Searching the presence of *Legionella* in the hospital water system is considered as one of the risk assessments in the hospitals. To obtain significant results from the *Legionella* search process, it is of crucial importance to take samples which best represent the plumbing system. The procedure used for the laboratory analysis of samples also should allow successful isolation of the culprit bacteria. In this article, basic principles of *Legionella* investigation in the plumbing systems are summarized so as to keep the hospital-associated Legionnaires' disease under control.

Key words: Legionnaires' disease, nosocomial infection, water microbiology

GİRİŞ

Lejyoner hastalığı çeşitli araştırmalara göre, toplumdan kazanılmış bakteriyel pnömonilerde ilk beş etiyoloji arasında yer almaktadır⁽¹⁻³⁾. Lejyoner hastalığı, hastane-kaynaklı olarak da görülebilir. Farklı serilerde nozokomiyal pnömoniler arasında hastalığın insidansı %1-40 arasında değişmekte, sıklıkla ikinci sırada yer almaktadır^(4,5).

Gündelik pratik içinde ise, Lejyoner hastalığının hekimlerin karşısına oldukça ender çıkan bir hastalık gibi algılandığı ve çoğu durumda atlandığı gözlenmektedir. Klinik ve radyolojik özellikleri ile diğer pnömonilerden ayırt edilemediğinden, tanı ancak hastalığın akla getirilmesini takiben yapılan mikrobiyolojik inceleme ile konabilmektedir⁽⁶⁾. Spesifik tanı doğru hasta yönetimi açısından bir üstünlük sağladığı

gibi, hastalığın epidemik potansiyeli (bir kaynaktan yayılarak aynı anda çok sayıda bireyi etkileme olasılığı) nedeniyle de kritik öneme sahiptir; çünkü kaynak su sisteminin belirlenmesi, önlemlerin alınması ve böylece yeni olguların önlenmesi şüpheli olgunun tanısına dayanmaktadır.

LEJYONER HASTALIĞI KONTROLÜNÜN ESASLARI

Kontrol mekanizmalarının harekete geçirilebilmesi için kesin tanının konmasını takiben olgunun ilgili birimlere (Halk Sağlığı Müdürlüğüne ve eğer hastane kaynaklı olgu söz konusu ise aynı zamanda hastane enfeksiyon kontrol komitesine) bildirimini esastır. Lejyoner hastalığı, Sağlık Bakanlığının ilk olarak 1996'da yayımladığı genelge ile ülkemizde bildirimini zorunlu hastalıklar arasına girmiştir. O tarihten bu

Alındığı tarih: 23.10.2012

Kabul tarihi: 15.12.2012

Yazışma adresi: Efsun Akbaş, Cumhuriyet Mah. Karadere Cad. 25. Sok. No:4/1, Güzelçamlı / Aydın

e-posta: efsun.akbas@gmail.com

yana, hastalığın kontrolü ile ilgili bir program da yürütülmektedir. Program 2001 yılında yayınlanan yeni bir genelge ile güncellenirken, Sağlık Bakanlığı da Avrupa Legionella Enfeksiyonları Çalışma Grubuna (EWGLI) girmiştir (7,8). Bu gelişmeyi takiben, veri akışının artmasına paralel olarak ülkemiz kaynaklı seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı sorununun boyutları daha iyi görünür hale gelmiştir. Dolayısıyla, bir yandan hastalığın kontrolü ile ilgili önemli ilerlemeler kaydedilirken, diğer taraftan bu süreç, programın eksik yönlerini açığa çıkarması bakımından da işlev görmüştür. Farkındalık düzeyinin düşüklüğü ya da laboratuvar altyapısının yetersizliği gibi nedenlere bağlı olarak, olguların %90'dan fazlasının ülkesine döndükten sonra tanımlanabilmesi ya da program kapsamında olmadıklarından hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı sorununun boyutlarının bilinmemesi söz konusu eksiklikler arasında değerlendirilmektedir. Bakanlık yakın zaman önce programı yeniden güncellemek üzere çalışmalar başlatmış olup, kapsamını hastane kaynaklı Lejyoner hastalığını da içerecek şekilde genişletmeyi hedeflemektedir (kişisel iletişime dayalı bilgi).

Lejyoner hastalığının ortaya çıkışı, çevresel bir rezervuarın varlığı ve etkenin uygun bir yoldan (aerosol inhalasyonu, aspirasyon) alınması kadar, konağın duyarlılığı ile de yakından ilişkilidir. Hastalığın ortaya çıkmasında bazı risk faktörlerinin (>50 yaş; erkek olma; sigara-alkol bağımlılığı; kalp yetmezliği, kronik akciğer hastalığı ve diabetes mellitus gibi altta yatan nedenlerin varlığı; transplantasyon, kemoterapi, kortikosteroid tedavi gibi immün sistemi baskılayan durumlar) rolü iyi bilinmektedir (9). Cerrahi girişim yapılmış olguların da (özellikle baş-boyun cerrahisi) yüksek riskli bir grup olduğuna dikkat çekilmiştir. Riskin kaynağının genel anestezi veya endotrakeal entübasyon uygulamaları olduğu tahmin edilmektedir (10,11). Lejyoner hastalığı son yıllarda artan sıklıkta çocuk yaş grubundan ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinden de bildirilmektedir (12,13).

Hastaneler risk grubu bireylerin genel popülasyona göre daha yoğun bulunduğu yerler olarak önem kazanır ve Lejyoner hastalığı için başlı başına bir risk çevresidir. Hastalık bu çevrede sıklıkla ağır seyirli ve yüksek mortaliteye sahip olup, yatış süresinin uzaması ve artan maliyetler yüzünden ek hastalık yükü yaratması nedeniyle önem kazanır. Dolayısı ile hasta-

nelerde etkin kontrol programları yürütülmesi yaygın bir şekilde zorunluluk haline gelmiştir (14-16).

Bir hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı kontrol programının iki temel bileşeni su sistemi yönetimi ve aktif olgu sürveysidir (15-17).

Su sistemi yönetimi; basitçe bina su sisteminin *Legionella* yerleşimine izin veren şartlar (risk) bakımından değerlendirilmesi ve tesisatta düzenli olarak (rutin) koruyucu önlemlerin uygulanması ile ilgili süreçler şeklinde tanımlanabilir. Koruyucu önlemler; *Legionella*'ların üremesini engellemek için su sisteminin işletilmesi ve bakımı ile ilgili başlıca iki esasa dayanan faaliyetlerdir. Birincisi, tesisat içi suyun sıcaklığını 20-50°C aralığının dışında tutmak, diğeri de kalker, sediment ve biyofilm sistemden uzaklaştırmaktır. Koruyucu önlemlerin, *Legionella* türleri saptanmamış hastanelerde de rutin olarak uygulanması önerilir (15,17). Bu makalenin konusu olmadığı için burada koruyucu önlemlerin ayrıntısına girilmeyecektir. Ancak, mevcut genelgede konaklama tesisleri için tanımlanmış yöntemlerin (aynı ilkelere dayanması nedeniyle), hastanelerde de uygulanabileceğini belirtmekte yarar görülmektedir (7). Belli başlı uygulamalar için bir kontrol listesi ve zaman çizelgesi de Tablo 1'de verilmektedir.

Aktif olgu sürveysi ise; hastanede yatan hastaları, semptomların görülüşü yönünden takip etmek ve nozokomiyal pnömoni görülür görülmez *Legionella* antijenini veya kendisini aramaya yönelik tanı testlerinin uygulanmasını sağlamak olarak özetlenebilir. Özellikle cerrahi, transplantasyon, onkoloji, yoğun bakım gibi birimlerde yatan yüksek riskli bireyler aktif olgu sürveysininin hedef grubudur (17).

Hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı kontrol programı, hastanelerde öncelikle yönetimin desteğini ve ilgili bütün birimlerin (enfeksiyon kontrol komitesi, mali işlerden sorumlu birim, teknik işler servisi, enfeksiyon hastalıkları kliniği ve laboratuvarın) katılımını gerektirir. Pratik olarak ise, hem aktif olgu sürveysininin hem de su sistemi yönetiminin her hastanede enfeksiyon kontrol komitesi etkinliklerine entegre edilmesi önerilmektedir (15,18,19).

Hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı kontrol programları, seyahat ilişkili Lejyoner hastalığı kontrolü

Tablo 1. Lejyoner hastalığı kontrolü için rutin koruyucu önlemler kapsamında bir hastane su sisteminin kritik kontrol noktaları ve bu noktalarda düzenli yürütülecek uygulamaların sıklığı.

KRİTİK KONTROL NOKTASI	UYGULAMA*	SIKLIK
SICAK SU TANKI	1. Tankın temizliği (sedimentin uzaklaştırılması, dezenfeksiyon) 2. TBS (laboratuvarıda veya dip-slide test ile) 3. Tahliye musluğundan suyun sıcaklığının kontrol ölçümü	3-6 ayda bir 3 ayda bir Haftada bir
SOĞUK SU TANKI	1. Tankın temizliği (sedimentin uzaklaştırılması, dezenfeksiyon) 2. Suyun mikrobiyolojik incelemesi (hijyenik standartlara uygunluk/içilebilirlik özelliği bakımından; fekal kontaminasyon ve TBS) 3. Serbest klor düzeyi ölçümü	3-6 ayda bir 3 ayda bir Her gün
HASTA ODALARI	1. Musluk ve duş başlıklarının kireçten arındırılması 2. Musluk ve duş başlıklarının dezenfeksiyonu 3. Duş ve musluklardan suyun en az 3 dakika akıtılması 4. Serbest klor düzeyi ölçümü (Rastgele seçilmiş birkaç odadan) 5. Sıcak su ısısının ölçülmesi (Rastgele seçilmiş birkaç odadan)	Ayda bir Haftada bir Boş kaldığı her gün Her gün Her gün
SU DAĞITIM TESİSATI	1. Fiziksel kontrol (tesisatın durumunu incelemek) 2. Suyun mikrobiyolojik incelemesi (hijyenik standartlara uygunluk/içilebilirlik özelliği bakımından; fekal kontaminasyon ve TBS) 3. Dezenfeksiyon	Ayda bir 3 ayda bir Yılda bir
SOĞUTMA KULELERİ	1. Kulelerin mekanik temizliği ve kimyasal dezenfeksiyon 2. Sistemin tamamen boşaltılıp temizlenmesi, doldurulması 3. TBS (laboratuvarıda veya dip-slide test ile) 4. Kulelerin durumunu incelemek	3-6 ayda bir 3-6 ayda bir Ayda bir Haftada bir

TBS: Total bakteri sayısı

*Lejyoner hastalığı kontrolü kapsamında su sistemi yönetimi ile ilgili uygulama kayıtları düzenli olarak tutuluyor olmalıdır. Bu kayıtlar başlıca risk değerlendirme raporları, günlük/haftalık ölçüm kayıt tabloları, dezenfeksiyon-tesisat bakım kayıtları, su inceleme raporları vb. şeklinde sıralanabilir.

programlarından farklı bazı uygulamaları da önerir. Bunlardan biri; olgu çıkmamış olsa bile hastane binaları su sistemlerinin düzenli aralıklarla (örneğin, yılda bir kez) *Legionella* kolonizasyonu açısından incelenmesi olup, amacı koruyucu önlem programının düzgün çalıştığına dair (validasyon için) kanıt sağlamaktır (7,19). Bir turistik tesis su sisteminin ise, olgu görülmediği sürece, *Legionella* varlığı açısından rutin izlenmesi önerilmemektedir; buna karşın ilgili düzenlemeler, tesisin su sisteminde koruyucu önlemlerin rutin uygulanmasını zorunlu kılar (7,18).

RİSK DEĞERLENDİRMESİ

Hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı kontrolü programını ilk kez uygulamaya koyacak hastaneler için başlangıç noktası bir risk değerlendirmesi yapmaktır. Hastanede potansiyel risk için değerlendirme yapılırken, Freije ve Barbaree (17) şu altı kritik sorunun yönlendirilmesini önerir.

a. Hastalarınızın ne kadarı immün baskılanmış bireylerdir? Bir hastanenin hasta profili içinde immün baskılanmış bireyler ne kadar çok ise riskin o kadar yüksek olduğu kabul edilmektedir. Bununla

birlikte immün baskılanmış olgu olmaması riskin olmadığı anlamına gelmez (17).

b. Daha önce hastanenizde hiç Lejyoner hastalığı olgusu saptadınız mı? Bir hastanede daha önce olgu çıkmış olması riskin devam ediyor olabileceğine dair önemli bir göstergedir. Özellikle binada koruyucu önlemlerin alınmadığı ve dezenfeksiyon uygulanmadığı durumda ya da olgunun çıktığı dönemde önlem alınmış iken, sonradan terk edilmiş olması halinde risk hayli yüksektir. Öte yandan, bir hastanede önceden olgu çıkmamış olması, olgu çıkmayacağı anlamına gelmez. Çoğu durumda, olgular, ya bugüne dek aranmadıkları için ya da yeterince duyarlı teknikler kullanılmadığı için saptanamamış olabilir (17).

c. Bina su sisteminizde *Legionella* kolonizasyonunu önleyici tedbirler uygulanıyor mu? Bina tesisatı teknik bakım ve işletmesi *Legionella* kolonizasyonunu önleyici tedbirleri içerdiği oranda, riskin azaldığı bilinmektedir. Hem teknik servisin hem de enfeksiyon kontrol komitesinin göz önüne alması gereken önemli bir konu su kesintilerinin etkisidir. Şebeke suyunun herhangi bir nedenle kesildiği ve yine sisteme su verildiği hallerde risk ciddi oranda artmaktadır.

Kesinti ile meydana gelen basınç farkı ve suyun verilmesiyle oluşan tesisat içi türbülans sedimentin hareketlenmesine ve sediment içeriğindeki *Legionella*'ların dolaşıma girmesine yol açabilmektedir. Bir deneysel çalışmada tesisat içi basınç değişikliğinin sudaki mikroorganizma sayısını 30 kat artırdığı gösterilmiştir ⁽²⁰⁾.

d. Hastaneniz ne kadar büyük? Binaların büyüklüğü ile tesisat içinde *Legionella* kolonizasyonu olasılığı neredeyse doğru orantılıdır. Bunun, bina büyüdükçe karmaşık hale gelen tesisat yapısında sediment ve biyofilm oluşumu, kalker katmanlarının gelişimi, son kullanma noktasına ulaşana dek sıcak suyun soğuması, ölü dallanmaların çoğalması gibi *Legionella* kolonizasyonunu teşvik eden faktörlerin küçük bina su sistemlerine nazaran daha çok ve çeşitli olmasına bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Soğutma kuleleri için ise, büyük olanların küçük kulelerden daha güvenli olabileceği düşünülmektedir ⁽¹⁷⁾.

e. Hastaneniz ne kadar yaşlı? Hastanenin (su tesisatının) yaşı da önemli bir risk parametresidir. Tesisat ne kadar yaşlı ise (tanklar ve borularda biyofilm ve korozyon o kadar ileri düzeyde olacağı için) *Legionella* kolonizasyon riskinin de o denli yüksek olduğu kabul edilmektedir. Ancak, bu bilgi yeni binalarda risk olmadığı anlamında yorumlanmamalıdır; yeni olmasına rağmen, yüksek düzeyde *Legionella* kolonizasyonu saptanmış çok sayıda örnek vardır ⁽¹⁷⁾.

f. Su sisteminizde *Legionella* türleri saptandı mı? Hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı söz konusu olduğunda risk değerlendirmesinin önemli adımlarından biri tesisatın değişik noktalarından alınan örneklerin *Legionella* varlığı yönünden incelenmesidir. Tipik bir hastane tesisatı oldukça karmaşık bir sistemdir. Böyle karmaşık bir sistemde, yukarıda sıralanmış ve *Legionella* üremesi açısından önemli olabilecek bütün faktörlerin bir arada etkisinin nasıl sonuç doğuracağı hesaplanamayabilir. Bu nedenle su örneklerinde *Legionella* varlığının araştırılması (pozitif veya negatif bir sonuç elde edilebildiği için) riskin değerlendirilmesinde somut veri sağlayan kullanışlı bir yöntem olarak kabul edilir. Bugüne kadar sudaki *Legionella* miktarı ile hastalığın görülüşü arasında doğrusal bir ilişki kurulamadığı biliniyor olsa da test edilen örneklerden ne kadar çoğu *Legionella* pozitif ve koloni sayımı ne kadar yüksek ise hastalık riskinin

o denli yüksek olduğu genel kabul gören bir yaklaşımdır. Bazı sayısal ölçütler geliştirmiş olup, tesisat içi su örneklerinde 10CFU/ml'yi, eyleme geçmek için yeter düzey olarak kabul eden çevreler de mevcuttur. Yine de riskin yalnızca sudaki *Legionella* düzeyine dayalı olarak belirlenmesinin yeterli olmayacağı önemle vurgulanmaktadır ⁽¹⁷⁾. Su örneklerinden *Legionella* izole edilmesi esasen; o hastanede rastlanan nozokomiyal pnömonilerin Lejyoner hastalığı olabileceğini akla getirecek bir gösterge olarak önem kazanmaktadır. Öyle ki; hastane su sisteminde özellikle *L. pneumophila* serogrup 1 izole edilmiş ise, nozokomiyal pnömoni gelişen her olguya üriner anti-jen testi uygulanması bir standart olarak önerilmektedir ^(14,15).

Suda total bakteri sayımı (TBS) testleri de risk değerlendirmesine katkı sağlayabilir. Soğutma kuleleri ve tanklarda, daha az sıklıkla da son kullanma noktalarına ait su örneklerinde organizma yoğunluğunu görmek için TBS yapılması önerilir (Tablo 1). TBS, ilin halk sağlığı laboratuvarında yaptırılabilir gibi, dip-slide adı verilen pratik kitler ile teknik servis tarafından da uygulanabilir. Bu noktada belirtilmelidir ki, TBS sonucu yalnızca suyun kirlilik düzeyi için bir gösterge niteliğindedir; kesinlikle *Legionella* varlığını göstermez ya da TBS düzeyi ve *Legionella* varlığı arasında bir doğrusal ilişki kurulamaz ⁽¹⁹⁾. Yine de TBS yüksek ise bu; suyun organik içeriğinin zengin olduğunu, beslenme kaynağının bulunduğunu ve dolayısı ile koşulların *Legionella* çoğalmasını teşvik edici olabileceğini hatırlatması bakımından önemlidir. Öte yandan TBS'nin çok düşük olduğu durumlarda da suda yüksek düzeyde *Legionella* bulunabildiğine dair gözlemler mevcuttur ve düşük TBS düzeyinin güvenli bir duruma işaret ettiği anlamında yorumlanmaması gerektiği önemle vurgulanmaktadır ^(17,19).

Risk değerlendirmesi yılda en az bir kez rutin çevresel sürveyansa paralel tekrarlanmalıdır. Bu süreçte bütün gözlem notlarının, ölçüm sonuçlarının ve uygulamaların kayıtlara geçirilmesi ve tüm kayıtların sonuç raporları ile birlikte arşivlenmesi önem arz eder ^(15,19). Hastane zaman içinde bu dokümanlara dayalı olarak kendini değerlendirebilir. Yapılanlara rağmen, olgu çıkması halinde sorunun kaynağını ya da eksik bırakılmış kısmını, bu kayıtları gözden geçirecek tespit etmek mümkün olabilir.

SUDA LEGIONELLA İNCELEMESİ İÇİN ÖRNEK ALMA ESASLARI

Su örneklerinin *Legionella* varlığı yönünden incelenmesinde doğru ve güvenilir sonuç elde edilmesi, doğru örnekleme ile yakından ilgilidir. Anlamlı bir sonuç elde edilebilmesi için, incelenecek su örneği sayısı da önemlidir. Bu nedenlerle, bina su sistemini iyi temsil edecek şekilde ve yeterli sayıda örnek alınmalıdır. Yeter (optimum) örnek sayısına şu hesaplama yaklaşımı ile karar verilebilir: (i) hastane ≤ 500 yataklı ise; servislerde son kullanma noktalarından (musluk ve duş başlıkları) en az 10 su örneği ve su tankları/depoları, varsa artezyen kuyusu ile soğutma

kulelerinden; (ii) hastane >500 yataklı ise; servislerde son kullanma noktalarından her 100 yatak için en az iki su örneği olacak şekilde ve su tankları/depoları ile varsa soğutma kulelerinden örnek alınır^(7,15,18). *Legionella* incelemeleri için su örneklerinin alınması ve naklinde izlenecek prosedür Tablo 2’de verilmiştir.

Örnek almak için son kullanma noktaları seçilirken bir öncelik belirleme yaklaşımı kullanmakta yarar vardır. Yüksek risk grubu bireylerin yattığı servislere öncelik verilmesi; varsa yoğun bakım lavabo muslukları, nemlendiriciler, ventilatör ve nebulizörler ile dekoratif su şelalesi ve buz makinelerinden de örnek alınması önerilir. Personel odaları, idari birimler,

Tablo 2. Legionella incelemeleri için su örneklerinin alınması ve gönderilmesinde izlenecek prosedür.

Örneklerin alınması

Musluk/duş başlığından eküvyon örneği alma Musluk hafifçe açılır, birkaç damla su akıtılır ve musluk ağız/duş başlığının ıslanması sağlanır. Çift eküvyon birlikte tutulur; duş başlığı örneği alınmıyorsa pamuklu uçlar başlığın tüm yüzeyine hafif kuvvet uygulayarak ve çevrilerek sürtülür; ardından hafifçe akıtılarak tüpün içine 1-2 ml su konur, eküvyonlar bu tüpe daldırılır ve kapağı kapatılır. İşlem bitince su tazyikli bir şekilde açılır; ~1 dk akması sağlandıktan sonra suyun sıcaklık ve klor düzeyi ölçülür, örnek formuna kaydedilir. Musluk örneği alınmıyorsa eküvyonlar musluk ağızından içeri olabildiğince sokulur; içeride dört kez ve hafif kuvvet uygulayarak çevrilir; işlem yukarıda duş başlığı için anlatıldığı gibi tamamlanır. NOT: *Legionella*’ların saptanmasında musluk/duş başlıklarından eküvyon örneklerinin incelenmesi, su örneklerinin incelenmesine nazaran daha verimli bir yöntemdir. Ancak, sahada eküvyonlu tüp temini sorun olabilmektedir. Ayrıca bu şekilde alınmış örnekler laboratuvarında bir defada incelenip tüketildiği için, şahit numune kalmaması bir dezavantaj oluşturabilmektedir.

Musluk/duş başlığından su örneği alma Musluk hafif açılır ve su beklemeden musluk/duş başlığından kaba doldurulur. İşlem bitince su tazyikli bir şekilde açılır; ~1 dk akması sağlandıktan sonra suyun sıcaklık ve klor düzeyi ölçülür, örnek formuna kaydedilir. NOT: Bir noktadan hem eküvyon ile hem de su örneği almak isteniyorsa, su örneği, eküvyon örneğinden önce alınmalıdır. Eküvyon örneğinin ve su örneğinin laboratuvarında birleştirilmeksizin, ayrı ayrı incelenmesi gerekir.

Tank/depo örneği alma İdeali tabana yakın bir tahliye musluğu bulunmasıdır. Tahliye musluğu mevcutsa tanktan iki örnek alınmalıdır. Birinci şişeye musluk açılır açılmaz su doldurulur ve etikete tankın adı ile birlikte “1. örnek” ibaresi yazılır. Ardından suyun tazyikli olarak ~1dk akması sağlanır (dip sedimentinin hareketlenmesini sağlamak için) ve ikinci şişeye de su doldurulur, üzerine “2. örnek” yazılır. Ölçülen sıcaklık ve klor düzeyi örnek kayıtlarına kaydedilir. Tahliye musluğu olmayan tank/depodan daldırma yöntemiyle tek su örneği alınır; bu durum kayıt formuna da not edilmelidir. NOT: İlk yıl yapılan testlerde tank/depo sularında *Legionella* negatif bulunmuş ise; takip eden yıllarda rutin çevresel sürveyans kapsamından ikinci örneklerin incelenmesi çıkarılabilir.

Havalandırma sistemi soğutma kulesinden örnek alma Bina teknik servis elemanının yardımını gerektirir. İşlem sırasında (özellikle soğutma kulesi fanları çalışırken örnek alınmak isteniyorsa) maske (mümkünse HEPA filtreli) takılmalıdır. Soğutma kulesinin içine şişenin daldırılması yoluyla örnek alınır. Birden fazla soğutma kulesi olan binalarda her kuleden ayrı örnek alınmalı ve kulelerin adları veya numaraları şişelerin üzerindeki etiketlere kaydedilmelidir. Örneklerin ölçülen sıcaklık ve klor düzeyleri de su örnekleri formuna kaydedilmelidir.

Örneklerin kaydedilmesi Bütün örnekler bir liste halinde, alındıkları örnekleme noktasını en iyi tarif eden adlandırma ile kaydedilmelidir. Her bir örnek için ölçülen sıcaklık ve klor düzeyleri de forma yazılmalıdır. Forma örneklerin alındığı tarih ve saat mutlaka not edilmelidir. Hastanenin yatak kapasitesi, açık adresi ve iletişimden sorumlu kişinin iletişim bilgileri de formda yazılı olmalıdır.

Örneklerin laboratuvara gönderilmesi

Hastanenin kendi laboratuvarına gönderme Özel bir önlem gerekmez. Örnekler uygun bir taşıma kabına düzgünce yerleştirilmeli, kırılma-dökülme önlemleri alınmalıdır. Örneklerin kaydedildiği form da mutlaka örneklerle birlikte laboratuvara iletilir.

Uzak laboratuvara gönderme Su örnekleri uzak bir laboratuvara kargo veya kurye ile gönderilebilir. Örnekler uygun bir taşıma kabına düzgünce yerleştirilmeli, kırılma-dökülme önlemleri alınmalıdır. Su örnekleri 48 saat içinde laboratuvara ulaştırılabilecekse soğuk zincir gerekli değildir. Yine de örneklerin mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaşması sağlanmalıdır. Örneklerin kaydedildiği form mutlaka örneklerle birlikte gönderilmelidir.

yemekhane, çamaşırhane ve tuvaletler gibi yerlerden örnek alınmasına gerek yoktur. Olabiliyorsa bina teknik servisi su dağıtım sisteminin bir krokisini temin etmeli; alınacak örneklerin dağılımı bu kroki-den yararlanılarak belirlenmelidir⁽¹⁷⁾.

Bir öncelik belirleme yapılacak ise, sıcak su sistemi de ilk sırada gelmelidir. Binaların merkezi sıcak su sistemleri *Legionella*'ların üremesi için ideal şartlara sahiptir. Uygulamada, kullanıcı konforu açısından ve ekonomik nedenlerle, suyun sıcaklığının yaygın bir şekilde 40-50°C dolayında (tanklarda ~50°C, son kullanma noktalarında 40-45°C) tutulduğu göz önüne alınırsa, üreme ısı aralığı 20-50°C olan bu mikroorganizmalar için sıcak su tesisatları primer çekim alanlarıdır. Özellikle sıcak su tanklarının tabanı hem suyun en ılık olduğu, hem de sediment ve biyofilmin en fazla biriktiği yer olarak organizmanın üremesi için kusursuz bir ortam sağlar. Sıcak su boruları da kolonizasyon için tercih edilen ortamlardır. Vana, musluk ve bağlantı parçalarının contaları ile boru çeperlerinde meydana gelen kalker ve biyofilm katmanları, *Legionella*'ların yalnızca yerleşip üremesini değil, aynı zamanda yüksek ısıya ve uygulanan kimyasal dezenfektanlara maruziyetini de önleyen bir koruyucu örtü gibi davranır. Ayrıca, daha az sıklıkla olsa da, *Legionella*'lar soğuk su sisteminde de çoğalabilir; özellikle bina içinde sıcak su tesisatına paralel giden soğuk su borularında suyun sıcaklığı kolonizasyona çok elverişli düzeylere gelebilmektedir^(17,19). Bu nedenle örnekleme yaparken, gerekiyorsa bazı soğuk su örneklerinin risk değerlendirmesine paralel olarak toplanması da önerilir.

Suda *Legionella* incelemesi için bir örnekleme noktasından 100-150 ml su alınması yeterlidir. İdrar örneği almak için kullanılan örnek kapları (steril, burgu kapaklı, plastik) bu amaçla da kullanılabilir. Ancak, örneklerin gönderileceği laboratuvarın inceleme prosedürü daha büyük miktarda (örn. 1 litre) su örneği gerektiriyor olabileceğinden ilgili laboratuvar ile istenen örnek miktarını öğrenmek amacıyla iletişim kurulmalıdır. Ayrıca, yakın zaman önce klorlama yapılmış bir su sisteminden örnek alınıyorsa, dezenfektan kalıntısını nötralize etmek amacıyla su örneklerinin konacağı kaplara önceden (ya da örnekleme sırasında) 100 ml su için 0.05 ml olacak şekilde 0.1N sodyum tiosülfat eklenmesi gerekir.

Eğer laboratuvar eküvyon ile alınan örneklerden de inceleme yapabiliyorsa, içine çift eküvyon konarak hazırlanmış steril burgu kapaklı tüpler kullanılır. Bütün kapların/tüplerin üzerine önceden etiket yapıştırılmış olmalıdır. Laboratuvara farklı yerlerden örnekler gelmiş olabileceği ve yalnızca numara verilirse karışıklık yaşanabileceği için; kapların üzerine örnek alınan noktanın adının da yazılması unutulmalıdır. Suyun alındığı andaki ısı derecesi ve klor düzeyi bilgisi önemli olduğundan, bir dijital su termometresi ve klor ölçüm cihazının örnekleme setinde kesinlikle bulunması gerekir. Bütün örneklerin sıcaklık ve klor değerleri alındıkları yerin adı ile birlikte örnek kayıt formuna da kaydedilir. Bu form örneklerle birlikte laboratuvara gönderilecektir.

Örnekler, hastanenin kendi laboratuvarında incelenebileceği gibi bir dış laboratuvara da gönderilebilir. Uzak bir laboratuvara su örneği gönderilirken her zaman ideal olan soğuk zincir kullanmaktır. Ancak, örnek hacminin büyük olduğu durumlarda soğuk zincir şartlarının sağlanması bazen önemli bir sorun haline gelmekte veya maliyetleri önemli oranda yükseltmektedir. Bu nedenle soğuk zincir kullanımına laboratuvara varış süresine göre karar verilmesi pratik bir yaklaşım olmuştur. *Legionella* incelemesi için alınan su örnekleri laboratuvara en fazla 48 saat içinde varması koşulu ile oda ısısında (<25°C) gönderilebilir. Bu süre içinde örneklerin daha yüksek ısıya maruz kalmaması sağlanmalıdır. Eğer nakil daha uzun sürecekse örneklerin alındığından itibaren 2-8°C'de tutulması ve gönderilmesi şarttır.

SULARDAN *LEGIONELLA* TÜRLERİNİN İZOLASYONUNDA TEMEL PRENSİPLER

Öncelikle, laboratuvarda suyun incelenmesinde kullanılan prosedür *Legionella*'ların başarılı bir şekilde izolasyonuna izin verirken kontaminant florayı olabildiğince engellemelidir. Bu amaçla, örnekleme noktasının özelliği de dikkate alınarak su, kültür plaklarına "direkt" ve/veya "asitle işlem sonrası" ve/veya "filtre edildikten ve asitle işlem yapıldıktan sonra" ekilir. Güvenilir bir sonuç için direkt veya işlemden geçmiş her bir örnek, biri inhibitör içermeyen buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar olmak üzere en az iki besiyeri plağına ekilmektedir^(21,22). Bu pratik olarak her su örneği için iki ile altı plak besiyeri gerektiği anlamına gelir. Kültür tekniği-

nin belli başlı adımları ve üreme şartları Şekil 1’de özetlenmektedir.

İnhibitör içermeyen BCYE, eğer suda baskılayıcı bir flora mevcut değilse *Legionella* türlerinin izolasyonu (özellikle zor üreyen türler) için ideal bir ortam sağlar. Ancak, suda çoğu kez bir flora bulunduğunu hesaba katmak gerektiğinden, her su örneğinin inhibitör (glisin, antimikrobiyal vb.) içeren BCYE bazlı bir besiyerine daha ekilmesi kuraldır ^(21,22). Glisin, laboratuvarında *Legionella* türlerinin sulardan izolasyonu ile ilgili çalışmaların başlangıcından bu yana çevresel floranın üremesini engelleyen en ideal maddelerden birisi olarak kabul edilmiştir ^(23,24). Bu nedenle su örnekleri öncelikle glisinli bir besiyerine ekilir. Yaygın kabul görmüş protokollere göre glisin içeren besiyerleri olarak Modified Wadowsky-Yee (MWY; Oksoid) ya da dye-glycine-vancomycin-polymyxin B (DGVP; Remel, Becton Dickinson) tercih edilebilir ⁽²¹⁾.

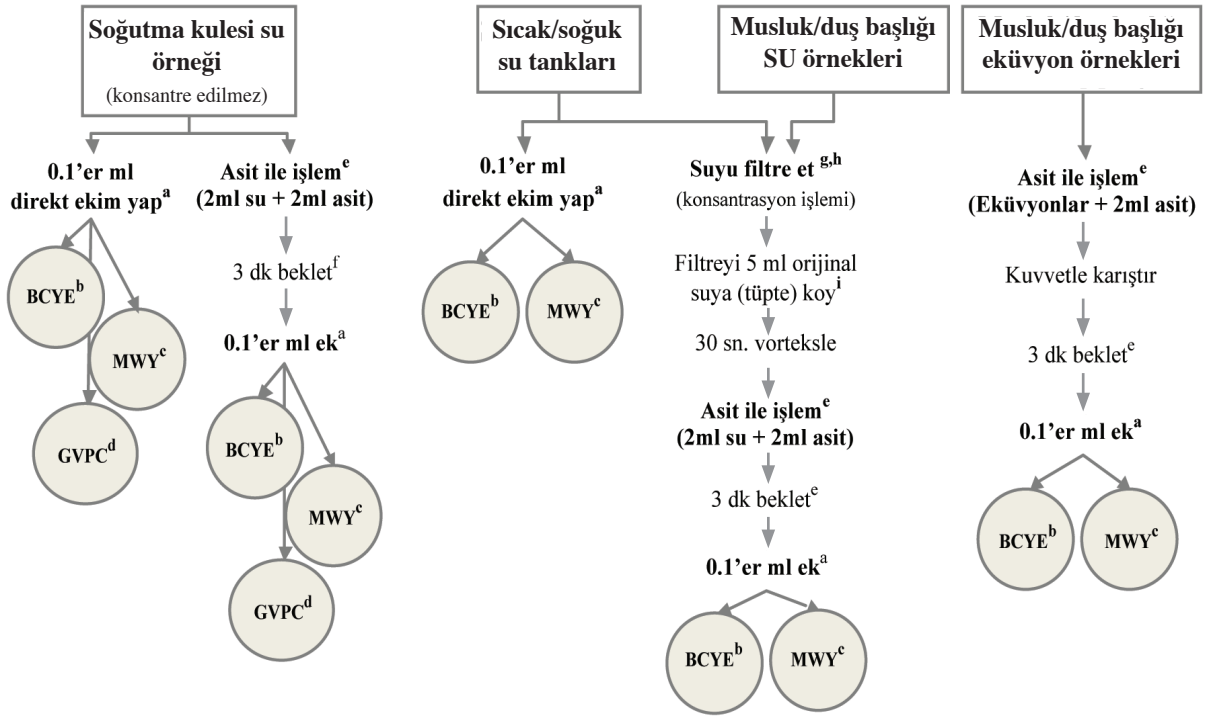
Soğutma kulesi sularının kültürü söz konusu olduğunda ise; dış atmosfere açık olan kuleler küf kontaminasyonuna maruz kaldıkları için ekim setine sikloheksimid (küf mantarlarının üremesini önleyen bir antifungal) içeren bir besiyerinin de ilave edilmesi önerilir (Şekil 1). Soğutma kuleleri, su sabit bir sistemde devrediyor olduğu için yoğun bir mikroflora içeriğine de sahiptir. Bu nedenle soğutma kulesi sularının, herhangi bir konsantrasyon yöntemi uygulanmaksızın asitle işlendikten sonra (ve hatta bazen 1/10, 1/100 dilüsyonlar elde edilerek) ekim yapılması idealdir. Sikloheksimid içeren besiyerleri olarak glycine-vancomycin-polymyxin B-cycloheximide (GVPC; Oksoid) ya da cycloheximid-colistin-vancomycin-cephalothin (CCVC; Becton Dickinson) kullanılabilir ⁽²¹⁾.

Anlaşılabileceği üzere, suyun kirlilik derecesi (sudaki kompetitif mikroflora içeriğinin düzeyi), örneklerin işleme şeklini ve ekim yapılacak besiyerlerini belirleyen bir faktördür. Temel prensip şöyle formüle edilebilir: Kompetitif mikroflora oranı düşük (az kirliliği) su örnekleri bir konsantrasyon işlemi takiben antimikrobiyal etkisi görece hafif olan besiyerlerine ekilir; kompetitif mikroflora oranı yüksek (kirliliği) olduğu tahmin edilen su örneklerine ise herhangi bir konsantrasyon işlemi uygulanmadığı gibi daha potent antimikrobiyalleri içeren besiyerlerinin kullanılması tercih edilir ⁽²¹⁾.

Legionella izolasyonunda başarı için besiyeri pH’ı da kritik öneme sahiptir ve ister ticari olarak hazır, ister laboratuvarında yapılmış besiyerleri olsun, pH’ın 6.9 ± 0.05 olduğu kontrol edilmelidir. Bunun için kalibre edilmiş dijital pH metreler kullanılmalıdır. Besiyerinin laboratuvarında yapılması, pH’ın istenildiği gibi ayarlanmasına olanak verdiğinden dolayı avantaj sağlar.

Yeri gelmişken belirtilmelidir ki; sudan *Legionella* izolasyonunda kullanılan besiyeri ve tekniklerin klinik örnekler için de kullanılabileceği düşüncesi yaygın yanlışlıklardan biridir. Benzerlikler varsa da, farklılıklar her iki durumda da organizmanın izolasyonunda başarı için belirleyici öneme sahiptir ⁽²¹⁾. Örneğin, glisin çevresel örneklerde bulunan kontaminant bakterilerin inhibisyonu için elzem iken, klinik örneklerde de maya mantarlarının bulunma olasılığını göz önüne alan bir bileşime gereksinim vardır. Bu nedenle klinik örneklerin kültürlerinde kontaminant maya mantarlarını baskılamak amacıyla anisomycin içeren bir besiyeri kullanmak esastır. BCYE bazlı anisomycin içeren besiyerleri olarak, polymyxin B-anisomycin-vancomycin (PAV; Remel, Becton Dickinson) ve polymyxin B-anisomycin-cefamandole (PAC; Remel, Becton Dickinson) ya da PAV’ın benzeri BMPA (Oxoid) önerilebilir ^(21,25).

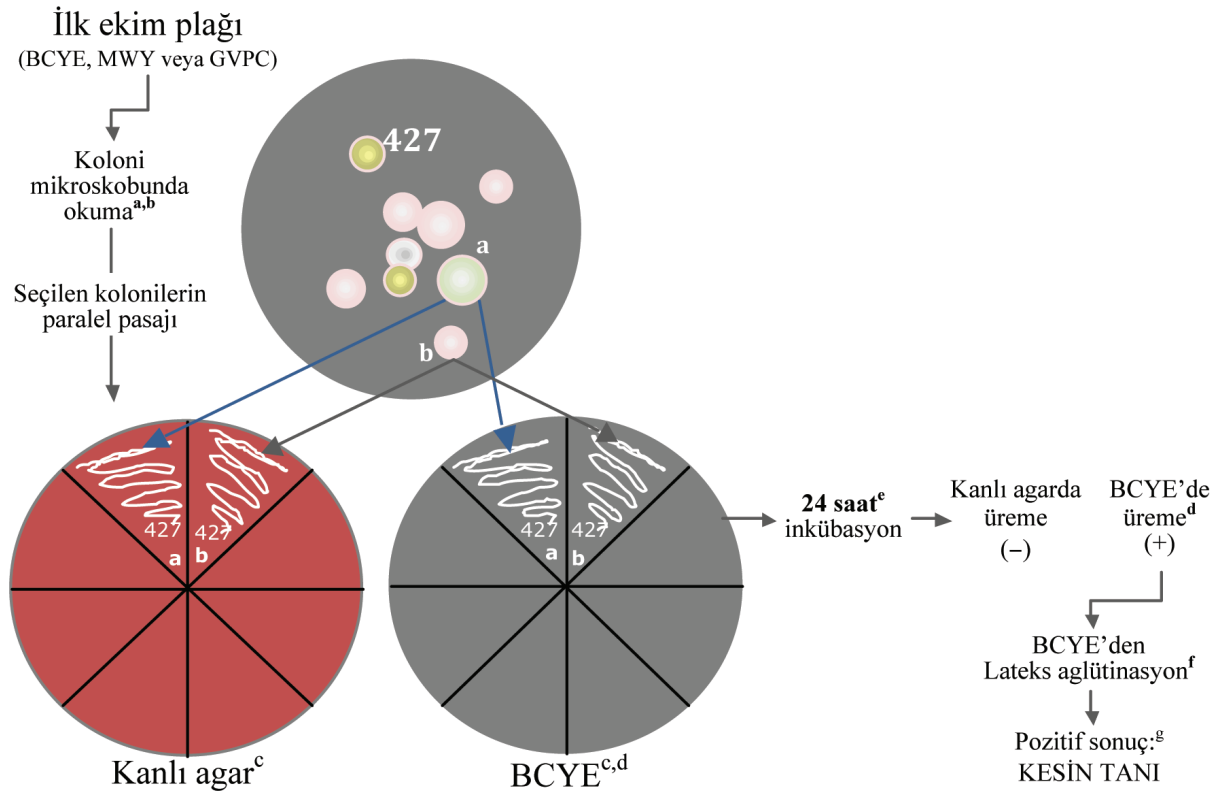
Legionella türleri genellikle 2-7 günde görüntü koloniler meydana getirirler. Plakların üçüncü günden sonra okunması tercih edilir. İlk identifikasyon basamağı makroskopik değerlendirmedir; bu amaçla plaklar koloni mikroskopunda (stereomikroskop; X10 büyütmede) oblik-ışık altında incelenirler. *Legionella* türleri ile uyumlu koloniler 1-3 mm çapında, yüzeyleri düzgün, hafif bombeli, merkezleri gri-beyaz ve kenarları yeşil, mavi, mor, veya pembe buzlu cama benzer tipik bir görünüme sahiptirler. Bir su örneğinde birden fazla farklı serogrup veya tür *Legionella* bulunması olasıdır ve bunlar üreme plağında koloni görünümündeki farklılıklar ile (örn. büyük ve küçük koloniler gibi) ayırt edilebilirler. Bazı *Legionella* türleri de (*L. anisa*, *L. gormanii*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*) UV ışık ile mavi-beyaz floresan veren koloniler yaparlar. Genellikle daha yavaş üreyen ve oldukça küçük (toplu iğne tepesi kadar) koloniler yapan bu türlerin primer identifikasyonu için plakların ayrıca 362 nm UV ışık (Wood lambası) altında da incelenmesi önerilir.



Şekil 1. Farklı örnekleme noktalarından alınmış örneklerin laboratuvarda kültür için hazırlanmaları ve primer kültür besiyerlerine ekimleri için akış şeması.

* Şema ile özetlenen kültür prosedürü, 1999'dan itibaren Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı (yeni adı: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu), Ulusal Legionella Referans Laboratuvarı tarafından uyarlanıp standardize edilmiştir.

- Ekim yapmadan önce her su örneği için gereken sayıda plak besiyeri buzdolabından çıkarılmış, oda ısısına getirilmiş olmalıdır. Bütün plaklar üzerine etiket yapıştırılmalıdır. Kömür içeriği nedeniyle koyu renk oldukları için cam kalemi ile yazılması tercih edilmez; numaralar görülmeyeceği için ekimler sırasında karışıklık meydana gelebilir. Etiketlerin üzerine suyun protokol numarası ile birlikte suyun ekilme şekli (D; direkt, AU; asit uygulama, FA; filtre-asit gibi) yazılmalıdır. Etiketleme başlangıçta yapılmadığı takdirde ekimler sırasında (özellikle çok sayıda su incelemesini aynı anda yapan laboratuvarlarda) karışıklık yaşanması kaçınılmazdır. Bütün ekimler için tam plak yüzeyi kullanılmalıdır. Suyun (direkt veya işlenmiş) 0.1ml'si plak besiyerinin üzerine konduktan sonra su, plak yüzeyine steril cam veya disposable plastik "L bağı" ile yayılır. Plagın ağız yukarı gelecek şekilde kapağı kapatılır. Oda sıcaklığında yüzeyin tamamen kuruması beklendikten sonra plaklar kapağı alta gelecek şekilde ters çevrilir ve 37°C'de, Legionella üremesi için ideal %95 rölatif nemli, normal atmosferde inkübatöre kaldırılır. Mumlu kavanoz veya %5 CO₂ atmosfer gerekli değildir. İnkübatör tabanına geniş bir tepsi ile distile su konması gerekli nem oranını sağlar; kuru kalmasına izin verilmemelidir, tepsi düzenli aralarla kontrol edilerek eksilen su tamamlandırmalıdır. Yüzeysel kurumadan inkübe edilen plaklarda yayılarak üreme olacağından koloni sayımı yapılamaz. Bu nedenle yüzeyin tamamen kurduğundan emin olunmalıdır. Legionella türleri için üreme süresi 2-7 gün olup plaklar ideal olarak 4. günden itibaren okunabilir. Bazı türler daha geç üreyebileceği için, üreme görülmeyen plakların inkübasyon süresi 14. güne kadar uzatılabilir.
- BCYE: Buffered charcoal yeast extract agar; Legionella izolasyonu için temel besiyeridir.
- MWY: Modified Wadowsky-Yee medium. Tesisat içi su örnekleri için önerilir. Bu besiyerinin yerine DGVP (dye-glycine-vancomycin-polymyxin B) besiyeri de kullanılabilir.
- GVPC: Glycine-vancomycin-polymyxin B-cycloheximide medium. İçeriğindeki sikloheksimid küf mantarlarının inhibisyonu içindir. Bu nedenle GVPC daha çok soğutma kuleleri gibi atmosfere açık oluşu nedeniyle küf mantarı kolonizasyonu sık görülen suların kültüründe diğer (MWY) inhibitör besiyerini tamamlayıcı olarak kullanılır. GVPC yerine CCVC (cycloheximid-colistin-vancomycin-cephalothin) besiyeri de kullanılabilir.
- Asit solüsyonu olarak pH'sı 2.2 olan HCl-KCl solüsyonu kullanılır. Hazırlanışı: Önce stok 0.2N HCl ve stok 0.2N KCl hazırlanır. 100 ml distile suya 5.3ml 0.2N HCl ve 25 ml 0.2N KCl eklenir. Filtrasyon ile veya otoklavlanarak steril edilir. Oda ısısında bir yıl raf ömrü vardır.
- Bu işlem yapılırken laboratuvarcı bir zamanlayıcı (timer) kullanılmalıdır. Asit ile muamele süresi plâklara ekim dahil toplam beş dakikayı geçmemelidir.
- Filtrasyon, Legionella'ların düşük konsantrasyonda olduğu durumlarda izolasyon şansını artırmak için, suyu konsantre etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bütün örnek tipleri filtrasyon gerektirmez; özellikle soğutma kulesi suları zengin mikroflora içeriğine sahip olduklarından dolaylı filtre edilmemelidir; aksine sulandırılmaları gerekebilir. Genellikle suda mikroorganizma içeriğinin en az olduğu varsayılan musluk/duş başlığı sularının filtre edilmesi önerilir.
- Filtrasyon için 0.45 mikronluk filtreler kullanılabilirse de ideali 0.2 mikron gözenek çaplı polikarbonat filtrelerdir. Suyun 50 ml'sinin filtre edilmesi yeterlidir. Ancak, bazı su inceleme protokolleri daha fazla suyun filtrasyonunu gerektiriyor ve laboratuvar daha fazla su ile çalışıyor olabilir. Bu nedenle laboratuvara gönderilecek su miktarı için önceden o laboratuvar ile iletişim kurulmalıdır.
- Bu işlem için geniş ağızlı, burgu kapaklı bir tüp (örn. 50ml'lik Falcon tüp) tercih edilmelidir. Orijinal su yerine önceden steril edilmiş distile su da kullanılabilir.



Şekil 2. Su örneğinin primer kültüründe koloni mikroskopu ile belirlenen şüpheli kolonilerden kanlı agar ve BCYE agar plaklarına paralel pasaj yöntemi ve sonraki identifikasyon basamakları.

- Plakların ilk değerlendirmeleri koloni mikroskopu altında yapılır; düzgün, hafif bombeli, buzlu-cama benzer tipik görünümde koloniler seçilir. İlk değerlendirmede plakların ayrıca 362 nm dalga boyu UV ışık altında floresan veren bazı Legionella türlerinin (*L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* ve *L. gormanii*) varlığını belirlemek için de incelenmesi gerekir. Bu türlere ait koloniler "mavi-beyaz koloniler" olarak da adlandırılmaktadır. UV ışık için laboratuvar Wood lambası kullanılabilir.
- Suyun birim miktarındaki koloni sayısının rapor edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle okuma sırasında benzer görünümde koloniler sayılır ve çalışma formuna kaydedilir. Tanı kesinleştikten sonra yapılan sayımlar üzerinden suyun birim miktarındaki koloni sayısı hesaplanır.
- Pasaj için kullanılacak plaklar cam kalemi ile altı-sekize bölünür. Orijinal plakta Legionella olabileceği düşünülen ancak farklı görünümdeki her koloni alfabetik olarak (a, b, c...) numaralandırılır. Plak no (suyun laboratuvar kayıt no) ve koloni no pasaj yapılacak plağın bir bölmesine yazılır. Koloniden bir öze dolusu alınarak önce kanlı agara, sonra BCYE'ye numarası yazılmış bölmelere zikzak çizerek yoğun pasaj yapılır. Sonra sırasıyla seçilmiş diğer koloniler de benzer şekilde pasajlanır.
- Kanlıda üreme görülmediği, ancak BCYE'de üreme görüldüğü durum koloninin çok yüksek olasılıkla Legionella türü olduğu anlamına gelmektedir. Bu durumda BCYE pasajındaki üreme sonraki identifikasyon basamağında kullanılacaktır.
- Bazen (özellikle mavi-beyaz koloniler için) inkübasyon süresini uzatmak gerekebilir. Süre en fazla yedi güne kadar uzatılmalıdır.
- Bazı durumlarda polivalan/monovalan DFA reajenleri ile veya PCR ile teyit etmek gerekebilir.
- Şekil 1'de verilen prosedür kullanıldığında, pozitif bulunan örnekler için koloni sayıları uygulanan işleme göre (direkt ekim, filtre-asit, asit uygulama) aşağıdaki gibi hesaplanır:

1ml suda Legionella sayısı (cfu/ml) = Direkt ekim (D) için plakta sayılan koloni X 10

1ml suda Legionella sayısı (cfu/ml) = Filtre-Asit (FA) işlemi için plakta sayılan koloni X 2

1ml suda Legionella sayısı (cfu/ml) = Asit uygulama (AU) için plakta sayılan koloni X 20

Eküvyon örneğinde Legionella sayısı (cfu/eküvyon) = Plakta sayılan koloni X 20

Her farklı görünümdeki koloni tipi ayrı ayrı sayılmış olmalı, identifikasyon basamakları her birine ayrı uygulanmalıdır. Bir su örneği için sonuç raporu, pratik olarak-BCYE plağından yapılan koloni sayım hesabına eşdeğerdir. Eğer BCYE'de üreme olmadıysa veya aşırı üreyen flora baskısı altında sayım yapılamadıysa diğer (inhibitör içeren) besiyeri plaklarından yapılan hesaplamaların ortalaması sonuç olarak rapor edilir.

Laboratuvar, kullandığı sulandırma oranlarını çarpan şeklinde hesaba katarak suyun birim miktarındaki koloni sayısını da sonuç raporunda verebiliyor olmalıdır. Mikroskop altında incelemenin bir avantajı

koloni sayımı yapmanın mümkün olmasıdır. Bu nedenle koloni mikroskopu ile inceleme aşamasında Legionella şüpheli bütün koloniler sayılmalı ve kaydedilmelidir.

İdentifikasyonun ikinci basamağı şüpheli kolonilerin (ender bir-iki tür hariç) sistein içermeyen bir besiyerinde (örn. %5 koyun kanlı agar) üremediğinin gösterilmesidir. Bu amaçla primer kültürlerden seçilen her koloni “paralel ekim yöntemi” ile bir kanlı agar bir de BCYE agar besiyerine pasajlanır. Ekonomik olması bakımından bir plak besiyeri altıya veya sekize bölünerek kullanılabilir (Şekil 2). Yaklaşık 24 saat inkübasyonun ardından kanlı agarda üremeyip BCYE’de üreme gösteren bir pasajın büyük olasılıkla *Legionella* türü olduğu düşünülür ve bu pasajdan lateks aglütinasyon testi yapılarak kesin tanıya gidilir. Bir lateks aglütinasyon test seti genellikle en sık serogrup veya türlerin polivalan reajanlerini içermektedir; bunlar *L. pneumophila* serogrup 1 antiserumu, *L. pneumophila* serogrup 2-14 için polivalan reajan ve sık rastlanan non-pneumophila türler için polivalan reajan şeklindedir. Aglütinasyon testi ile kesin karara varılamayan bir durumda izolatu polivalan/monovalan Direkt Floresan Antikor (DFA) reajanleri ile veya Polimerase Chain Reaction (PCR) ile teyit etmek gerekebilir. Özellikle hiçbir antiserum ile aglütinasyon vermediği halde *Legionella* türü olduğu düşünülen izolatların teyit edilmesinde, genus spesifik primerler ile PCR uygulanması yararlı olabilir.

Laboratuvar, olgu ihbar edilmiş bir su sisteminin örneklerini inceliyorsa, su örneklerinden elde edilen izolatları (gerektiğinde olgunun izolatları ile karşılaştırma yapılabilmesi için) saklamaya da almalıdır. En yaygın tercih edilen yöntem %16 gliserol içeren sıvı besiyerinde, $\leq -20^{\circ}\text{C}$ ’de saklamadır.

SONUÇ

Lejyoner hastalığı, bir kaynaktan yayılarak salgın yapma potansiyeli nedeniyle halk sağlığı önemine sahip ve kontrol programı kapsamında izlenen bir hastalıktır. Özellikle hastane kaynaklı Lejyoner hastalığı önlenabilir bir enfeksiyon olarak kabul edilmekte; hastalığın önlenmesi için de hastanelerin (belli başlı hedefleri hastanede risk değerlendirme, rutin koruyucu önlemleri uygulamaya koyma ve aktif olgu sürveyansı olan) bir program yürütmesi önerilmektedir. Hastane su örnekleri de bu çerçevede su sistemine *Legionella* yerleşimini izlemek bakımından düzenli incelenir; çünkü özellikle, *L. pneumophila* SG1’ in varlığı gösterildiği takdirde hastanede rastlanan nozokomiyal pnömonilerde üriner antijen testi-

nin rutin kullanımı bir zaruret olacaktır.

Anlaşılabileceği üzere, sularda *Legionella*’ların aranmasına yönelik laboratuvar incelemeleri Lejyoner hastalığının kontrolü esasına dayalı program ve süreçlere entegre uygulamalardır. Laboratuvarında güvenilir ve anlamlı bir sonuç elde edilebilmesi ise örnekleme evresi de dâhil olmak üzere tanı için yeter (optimum) şartların sağlanması ile doğrudan ilgilidir. Örneğin, gereğinden fazla örnek toplanması maliyeti yükselteceğinden dolayı arzu edilmeyeceği gibi, maliyeti düşürmek amacıyla ekim plağı sayısının azaltılması vb. de kabul edilemez.

Hastane kaynaklı Lejyoner hastalığının ülkemizde kısa bir zaman içinde ulusal kontrol programı kapsamına gireceği göz önüne alınırsa, su örneklerinden *Legionella* analizi talebi artacak ve yeni laboratuvarlara gereksinim duyulacaktır. Pek çok laboratuvarın bugün yeterince aşına olmadıkları bu bakterinin tanısı ile uğraşmaya başlayacağını tahmin etmek zor değildir. Bu tahminden hareketle bu makalede laboratuvarlara doğru ve güvenilir tanı için bir temel oluşturulması amaçlanmıştır. Ayrıca hastanelerin sorumlu ekiplerine, hastalığın kontrolünde önemli olan konularla ilgili rasyonel bir çerçevenin verildiği de umut edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Ostergaard L, Anderson PL.** Etiology of community-acquired pneumonia. Evaluation by transtracheal aspiration, blood culture or serology. *Chest* 1993; 104:1400-7. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.104.5.1400>
2. **Stout JE, Yu VL, Muraca P, Joly J, Troup N, Tompkins LS.** Potable water as a cause of sporadic cases of community-acquired Legionnaires’ disease. *N Engl J Med* 1992; 326:151-5. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199201163260302> PMID:1727545
3. **Marric TJ, De Carolis E, Yu VL, et al.** Legionnaires’ disease - results of a multicentre Canadian study. *Can J Infect Dis* 2003; 14:154-8.
4. **Yu VL.** Nosocomial legionellosis. *Curr Opin Infect Dis* 2000; 13:385-8. <http://dx.doi.org/10.1097/00001432-200008000-00010>
5. **Sopena N, Sabrià M, Neunos 2000 Study Group.** Multicenter study of hospital-acquired pneumonia in non-ICU patients. *Chest* 2005; 127:213-9. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.127.1.213> PMID:15653986
6. **Vergis EN, Akbas E, Yu VL.** *Legionella* as a cause of severe pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 2000; 21:295-304. PMID:16088740
7. Seyahat İlişkili Lejyoner Hastalığı Kontrol Programı Genelgesi. Sağlık Bakanlığı, TSHGM, 01.05.2001-34.
8. Bulaşıcı Hastalıkların Bildirimi Sistemi Yönergesi (Bulaşıcı Hastalıkların İhbarı ve Bildirim Sistemi, Standart Tanı, Sürveyans ve Laboratuvar Rehberi-2004). Sağlık Bakanlığı, TSHGM, 24.02.2004-1534.
9. **Schlossberg D, Bonoan J.** *Legionella* and immunosuppressi-

- on. *Semin Respir Infect* 1998; 13:128-31. PMID:9643390
10. **Johnson JT, Yu VL, Best MG, et al.** Nosocomial legionellosis in surgical patients with head-and-neck cancer: implications for epidemiologic reservoir and mode of transmission. *Lancet* 1985; 2:298-300. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(85\)90349-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(85)90349-6)
 11. **Blatt SP, Parkinson MD, Pace E, et al.** Nosocomial Legionnaires' disease: aspiration as a primary mode of disease acquisition. *Am J Med* 1993; 95:16-22. [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90227-G](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(93)90227-G)
 12. **Franzin L, Scolfaro C, Cabodi D, Valera M, Tovo PA.** *Legionella pneumophila pneumonia* in a newborn after water birth: a new mode of transmission. *Clin Infect Dis* 2001; 33:e103-4. <http://dx.doi.org/10.1086/323023> PMID:11568855
 13. **Greenberg D, Chiou CC, Famigilletti R, Lee TC, Yu VL.** Problem pathogens: paediatric legionellosis--implications for improved diagnosis. *Lancet Infect Dis* 2006; 6:529-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70553-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70553-9)
 14. **Yu VL, Liu Z, Stout JE, Goetz A.** *Legionella* disinfection of water distribution systems: Principles, problems and practice. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1993; 14:567-70. <http://dx.doi.org/10.1086/646638>
 15. Allegheny County Health Department. Approaches to prevention and control of *Legionella* infection in Allegheny County health care facilities. Pittsburgh, ABD, 1997.
 16. **Stout JE, Muder RR, Mietzner S, et al.** Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28:818-24. <http://dx.doi.org/10.1086/518754> PMID:17564984
 17. **Freije MR, Barbaree JM.** *Legionellae* control in health care facilities: a guide for minimizing risk. U.S.A: HC Information Resources, Inc, 1996.
 18. **Akbaş E.** Lejyoner hastalığının önlenmesi ve kontrolünde hastane su sistemlerinin yönetimi. Günaydın M, Öztürk R, Ulusoy S, Gültekin M eds. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kitabı; 4-8 Nisan 2007; Antalya: Türkiye 2007; 334-52.
 19. World Health Organization. *Legionella* and the prevention of legionellosis. WHO. Geneva, 2007.
 20. **Brundrett GW.** *Legionella* and building services. Oxford: Butterworth Heinemann Ltd., 1992. PMID:1545259
 21. **Stout JE.** Culture methodology for *Legionella* species. Fallbrook CA: HC Special Report, 1998.
 22. Procedures for the recovery of *Legionella* from the environment. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: Center for Disease Control and Prevention (CDC), 1994.
 23. **Wadowsky RM, Yee RB.** Glycine-containing selective medium for isolation of *Legionellaceae* from environmental specimens. *Appl Environ Microbiol* 1981; 4:768-72.
 24. **Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM.** Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2118-23. PMID:7559959 PMCID:PMC228346
 25. **Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM.** Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2764-8. PMID:8253978 PMCID:PMC266009